

THÔNG BÁO KHOA HỌC

**HỘI CHỨNG HOẠI TỬ GAN TỤY Ở TÔM CHÂN TRẮNG
(*Litopenaeus vannamei*) NUÔI THƯỜNG PHẨM TẠI NINH THUẬN**

**HEPATOPANCREATIC NECROSIS SYNDROME
IN WHITELEG SHRIMP (*Litopenaeus vannamei*) FARMED IN NINH THUAN**

Nguyễn Thị Thùy Giang¹, Phạm Văn Toàn², Phạm Quốc Hùng³

Ngày nhận bài: 22/6/2015; Ngày phản biện thông qua: 27/7/2015; Ngày duyệt đăng: 15/3/2016

TÓM TẮT

Tôm chân trắng nuôi thương phẩm tại tỉnh Ninh Thuận thường xuất hiện các dấu hiệu bệnh lý như: gan tụy teo nhỏ, chai cứng, đen tối, nhợt nhạt, phù nề, mềm nhũn, ruột rỗng, phân trắng... Tôm bị bệnh có thể chết từ rải rác đến hàng loạt. 40 mẫu tôm bị bệnh và 10 mẫu tôm khỏe được thu và kiểm tra tác nhân gây bệnh như vi khuẩn, kí sinh trùng, nấm và virus. Kết quả nghiên cứu vi khuẩn xác định được 3 loài *Vibrio parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* và *V. vulnificus* với tần suất bắt gặp cao nhất (>60%) ở các mẫu tôm bị bệnh. Trong đó, kết quả PCR đã xác định sự có mặt của chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* được xem là tác nhân gây bệnh hoại tử gan tụy cấp (Acute hepatopancreatic necrosis disease-AHPND). Cảm nhiễm nhân tạo 4 nhóm vi khuẩn trên (*V. parahaemolyticus* AHPND-PCR(+), *V. parahaemolyticus* AHPND-PCR(-), *V. alginolyticus* và *V. vulnificus*) đều gây ra tỷ lệ chết ở tôm lần lượt là: 100, 47.7, 37.7 và 17.7% trong vòng 7 ngày. Tôm bị chết đều có những dấu hiệu bệnh lý giống như tôm bị bệnh ngoài tự nhiên. Nghiên cứu mô bệnh học cho thấy sự hoại tử nghiêm trọng ở mô gan tụy của tôm bị bệnh. Kết quả nghiên cứu cho thấy 4 nhóm vi khuẩn trên có liên quan đến hội chứng gan tụy ở tôm chân trắng nuôi tại Ninh Thuận. Trong đó, nhóm vi khuẩn *V. parahaemolyticus* AHPND-PCR (+) có độc lực cao nhất gây chết 100% trong vòng 48h sau cảm nhiễm. Các loài vi khuẩn *Vibrio* spp. còn lại đều có khả năng gây chết và gây tác hại đến cơ quan gan tụy của tôm chân trắng. Ngoài ra, không tìm thấy virus viêm gan tụy Hepatopancreatic Parvovirus, vi khuẩn *Rickettsia* gây bệnh hoại tử gan tụy ở trên tôm bị bệnh. Bằng phương pháp soi tươi, xác định tỷ lệ nhiễm vi bào tử trùng ở gan tụy của tôm khoảng 15-20%.

Từ khóa: hội chứng hoại tử gan tụy, tôm chân trắng, *Litopenaeus vannamei*, bệnh nhiễm khuẩn

ABSTRACT

Whiteleg shrimp farmed in Ninh Thuan province have recently died with the mortality up to 100%. The died shrimps showed abnormalities in hepatopancreas. 40 diseased and 10 health shrimp samples were collected to detect the causative agents and histopathological characteristics. The results showed the high prevalence (>60%) of *Vibrio* species such as *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* và *V. vulnificus* in diseased shrimp. By PCR technique, 21/31 strains of *V. parahaemolyticus* which was reported to be the culprit of Acute hepatopancreatic necrosis disease were found with the primer AP3/AP4. Four strains of *V. parahaemolyticus* AHPND-PCR (+), *V. parahaemolyticus* AHPND-PCR(-), *V. alginolyticus* and *V. vulnificus* were individually challenged in health shrimp by immersion at the concentration of 10^6 cfu/mL. These *Vibrio* strains caused the mortalities from 17.7% up to 100% during 7 days. The challenged shrimp showed abnormal signs:

¹ ThS. Nguyễn Thị Thùy Giang, ² ThS. Phạm Văn Toàn, ³ TS. Phạm Quốc Hùng: Viện Nuôi trồng thủy sản – Trường Đại học Nha Trang

empty gut, pale, shrinked hepatopancreas, white feces. Severe hepatopancreatic necrosis was observed by histopathological method. In conclusion, *V. parahaemolyticus* AHPND-PCR (+), *V. parahaemolyticus* AHPND-PCR (-), *V. alginolyticus* and *V. vulnificus* were involved in the hepatopancreatic necrosis syndrome in white-leg shrimp farmed in Ninh Thuan province. The high virulent *V. parahaemolyticus* AHPND-PCR(+) could cause the highest mortality of 100% in infected shrimp, during 48h post infection. No detection of Hepatopancreatic Parvovirus, Rickettsia, sporozoa and fungi were found. The prevalence of microsporidia infection was detected about 15-20% of diseased shrimp.

Keywords: hepatopancreatic necrosis syndrome, *Litopenaeus vannamei*, Vibriosis, bacterial disease

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong vài năm gần đây, tôm chân trắng nuôi thương phẩm tại Ninh Thuận thường bị chết từ rải rác đến hàng loạt với những dấu hiệu bệnh lý được thể hiện ở cơ quan gan tụy và tuyến tiêu hóa: teo nhỏ, chai cứng, đen tối, nhợt nhạt, phù nề, mềm nhũn, ruột rỗng... được gọi là hội chứng gan tụy ở tôm. Tuy nhiên, người nuôi tôm thường gặp nhiều lúng túng trong quá trình chẩn đoán và phòng trị bệnh do khó khăn trong việc xác định tác nhân gây bệnh chính. Lí do chính là vì cơ quan gan tụy là cơ quan đích của nhiều tác nhân gây bệnh nguy hiểm khác nhau: vi khuẩn giống *Rickettsia* gây bệnh hoại tử gan tụy (Necrotising Hepatopancreatitis - NHP), Hepatopancreatic Parvovirus-HPV gây bệnh ở tổ chức gan tụy, vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp (Acute hepatopancreatic necrosis disease-AHPND), hoặc kí sinh trùng thuộc nhóm vi bào tử. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm nghiên cứu về hội chứng gan tụy ở tôm nuôi ở Ninh Thuận, làm cơ sở để tiếp tục nghiên cứu tìm ra những biện pháp ngăn ngừa và phòng trị bệnh hiệu quả.

II. ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu

40 mẫu tôm bệnh và 10 mẫu tôm khỏe (25-30 con tôm/mẫu) được thu tại Ninh Thuận. Với các mẫu bệnh, lựa chọn các con tôm đã có bộc lộ dấu hiệu bất thường: lơ dờ, màu sắc cơ thể thay đổi, bỏ ăn, ruột rỗng, gan tụy biến đổi về hình dạng và màu sắc, mòn cụt các bộ phận

cơ thể nhưng vẫn còn sống. Do nhiều phương pháp phân tích được sử dụng, nên tôm bệnh trong mỗi mẫu đã được cố định và xử lý theo nhiều cách khác nhau: 10 con tôm bệnh/mẫu được vận chuyển sống về phòng thí nghiệm để phân lập vi khuẩn, kí sinh trùng và virus; 10 con tôm bệnh/ mẫu được cố định vào 2 lọ đựng cồn etylic 95% (5 con/lọ mẫu) dùng cho phân tích PCR. Số tôm còn lại được tiêm và cố định trong dung dịch Davidson (gồm: cồn 95%: 330 ml, formol 40%: 220 ml, acid acetic: 115 ml và nước cất 335 ml) dùng cho phân tích mô bệnh học. Các mẫu tôm khỏe chưa bộc lộ bệnh lý cũng đã được thu cho các phân tích đối chứng so sánh với mẫu bệnh.

2. Phương pháp phân tích mẫu

2.1. Phương pháp nghiên cứu vi khuẩn

Phương pháp nghiên cứu vi khuẩn ở cá và giáp xác được giới thiệu bởi (Whitman, 2004) được sử dụng để phân lập vi khuẩn từ bệnh phẩm lấy từ máu và gan tụy của các mẫu tôm. Để định danh vi khuẩn, kit API 20 được sử dụng cùng với tiến hành một số phản ứng sinh hóa khác: catalase, khả năng chịu đựng độ mặn, pH...

2.2. Phương pháp làm các tiêu bản mô gan tụy của tôm để kiểm tra nhanh HPV và vi bào tử

Dùng kéo và panh bóc tách giáp đầu ngực của tôm bệnh, lấy một chút mô gan tụy đặt trên lam sạch, nhỏ lên đó 1-2 giọt malachitegreen 0,2%, dùng lamen đẩy lên và quan sát ngay dưới kính hiển vi quang học ở độ phóng đại $\geq 200\times$ sẽ phát hiện dễ dàng các thể vùi đặc thù của HPV và ở độ phóng đại $\geq 400\times$ để phát hiện các vi bào tử chiếm chỗ trong gan tụy của tôm.

2.3. Phương pháp nghiên cứu mô bệnh học

Phương pháp mô bệnh học ứng dụng cho động vật giáp xác được giới thiệu bởi (Lightner, 1996) đã được sử dụng để xác định các biến đổi ở mô và tế bào của các cơ quan ở tôm bệnh, so sánh các bệnh lý này với mô của tôm khỏe và các biến đổi đặc trưng ở gan tụy của tôm bị các loại bệnh nhiễm khuẩn khác nhau đã được công bố bởi nhiều tác giả (Lightner, 1996; Hasson et al., 2009; Lightner et al., 2012; Tran Loc et al., 2013; Flegel & Lo, 2014; Joshi et al., 2014 và Nunan et al., 2014)

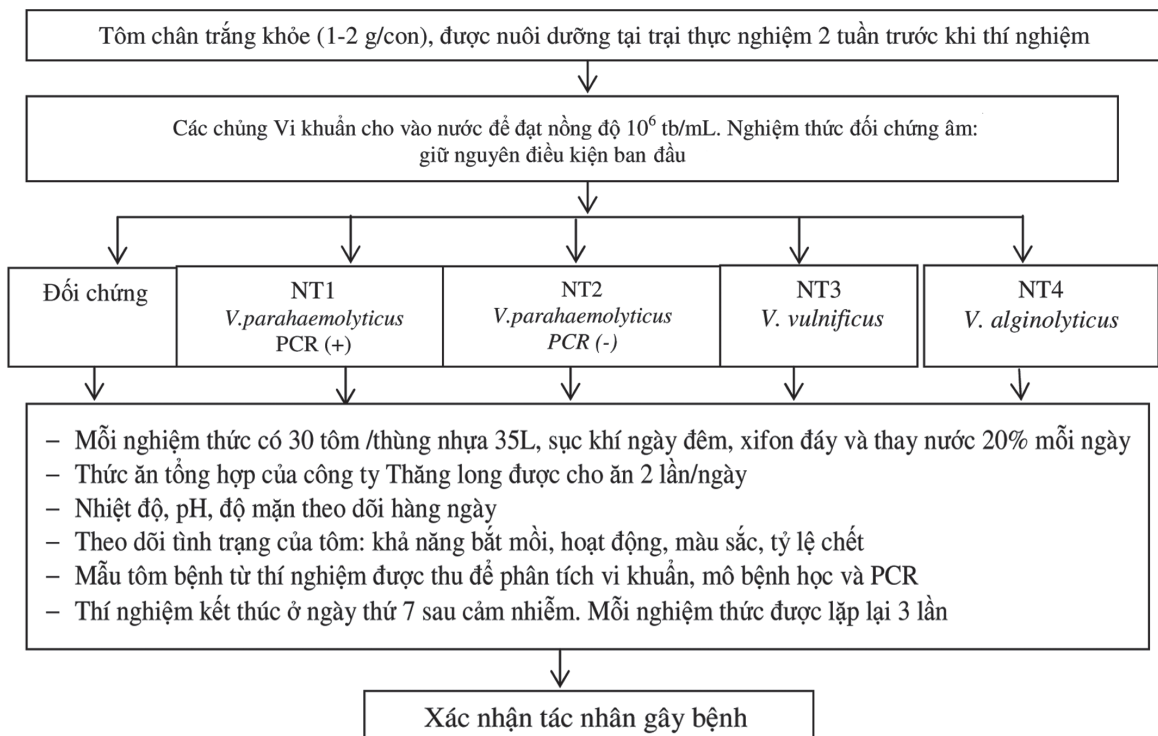
2.4. Kỹ thuật PCR (Polymerase Chain Reaction)

Quy trình kỹ thuật PCR được phổ biến bởi OIE (2012) và được bổ sung, phát

triển bởi Flegel and Lo (2014), Sirikharin et al. (2014), Sritunyalucksana et al, 2015 cho các đoạn mồi (AP1, AP2, AP3 & AP4) được thiết kế để nhận biết chính xác các chủng vi khuẩn thuộc loài *Vibrio parahaemolyticus* là tác nhân gây bệnh AHPNS/EMS. Mẫu được cố định trong cồn 95% và được tách chiết DNA bằng bộ kit DNeasy Blood & Tissue Kit (Cat: 69504) và được thực hiện tại Phân viện thú y Miền Trung và Trường ĐH Mahidol, Thái Lan.

3. Cảm nhiễm huyền dịch của vi khuẩn nghi ngờ vào tôm khỏe

3.1. Mô hình thí nghiệm cảm nhiễm



Hình 1. Mô hình thí nghiệm cảm nhiễm

3.2. Tạo huyền dịch từ các chủng vi khuẩn nghi ngờ

Chủng vi khuẩn nghi ngờ (có tần số gặp cao ở tôm bệnh) đã được lấy ra khỏi tủ đông sâu (-70°C), để ở nhiệt độ phòng 1 h sau đó nuôi cấy trên môi trường TSA (2% NaCl), ở nhiệt độ 28-30°C trong 24h. Huyền dịch của các chủng vi khuẩn này được tạo ra bằng cách lấy các khuẩn lạc hòa trong nước muối

sinh lý 0,85% vô trùng, sau đó vortex để huyền dịch được thuần nhất. Huyền dịch vi khuẩn được pha loãng và so màu theo thang độ đục của Mc Farland để có mật độ vi khuẩn ở 10⁶ tế bào/mL. Ngoài ra, mật độ vi khuẩn trong huyền dịch này cũng được kiểm tra lại bằng phương pháp đếm khuẩn lạc trên đĩa thạch với môi trường TSA.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

1. Dấu hiệu bệnh lý của tôm chân trắng bị hội chứng gan tụy

Từ 40 mẫu tôm chân trắng bị hội chứng gan tụy thu được từ ba huyện Ninh Hải, Ninh Phước và Thuận Nam của tỉnh Ninh Thuận,

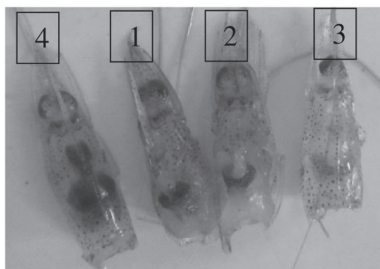
các dấu hiệu chính của bệnh đã được quan sát, chụp hình và mô tả. Hầu hết các trường hợp bị bệnh đều xuất hiện trong các ao nuôi thương phẩm từ ngày 20 đến ngày thứ 65 sau khi thả giống.

Bảng 1. Tần suất bắt gặp các dấu hiệu bệnh lý của tôm bị hội chứng gan tụy (n=40)

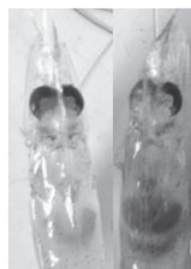
STT	Các dấu hiệu chính	Tần suất gặp	
		Tần số bắt gặp	Tỷ lệ (%)
1	Bệnh lý thể hiện ở cơ quan tiêu hóa	40	100
2	Gan tụy teo nhỏ, chai cứng, dai	35	87.5
3	Gan tụy mềm nhũn	5	12.5
4	Gan tụy có màu nhợt nhạt	31	77.5
5	Gan tụy có màu nâu đen	9	22.5
6	Đường ruột rỗng không có thức ăn	40	100
7	Màu sắc cơ thể đen tối	5	12.5
8	Mềm vỏ, óp	15	37.5
9	Còi cọc, chậm lớn	26	65
10	Kém ăn, bỏ ăn	34	85
11	Chết rải rác tới hàng loạt	40	100
12	Phân trắng	3	7.5

Một tỷ lệ rất cao (87.5 - 100%) của các mẫu tôm bị bệnh thu được thể hiện bị vấn đề về gan tụy và tiêu hóa như : cơ quan gan tụy teo nhỏ, chai cứng, ruột rỗng không có thức ăn và chết rải rác đến hàng loạt. Phần lớn trường hợp, gan tụy của tôm bị bệnh thường có xu hướng nhợt nhạt (77.5%), tuy nhiên có những trường hợp lại có màu đen tối hoặc đỏ sẫm (22.5%).

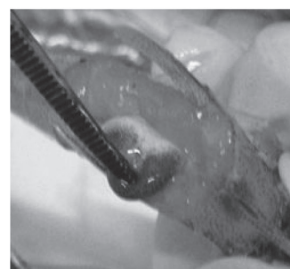
Các hiện tượng kém ăn, bỏ ăn, còi cọc cũng thường xuyên được ghi nhận từ các ao tôm bị bệnh. Các dấu hiệu bệnh lý này khá giống với dấu hiệu bệnh lý của hội chứng hoại tử gan tụy cấp (AHPNS/EMS) được mô tả bởi nhiều nhóm tác giả như Joshi et al. (2014); Leaño and Mohan (2012); Lightner et al. (2012); Nunan et al. (2014); Tran et al. (2013).



Tôm 1, 2 và 3 có gan tụy teo nhỏ, nhợt nhạt, dạ dày rỗng; Tôm 4: gan tụy bình thường



Tôm bên trái có gan tụy màu sắc nhợt nhạt và teo nhỏ



Gan tôm bị chai cứng và dai



Tôm có đường ruột rỗng và màu sắc cơ thể thay đổi

Hình 2. Dấu hiệu bệnh lý của tôm bị bệnh nhiễm khuẩn

2. Kết quả kiểm tra Hepatopancreatic Parvo-like virus (HPV) và kí sinh trùng

Không tìm thấy sự xuất hiện thể ẩn của virus HPV trong gan tụy của tôm bị bệnh. Trong khi đó, kiểm tra thấy tỷ lệ nhiễm kí sinh trùng vi bào tử trùng khoảng 15-20% bằng phương pháp nhuộm nhanh. Ngoài ra, ở một số ao bị bệnh, tôm có thể bị phân trắng hoặc cơ thể/mang đen tối đa 15%. Tuy nhiên, trong quá trình kiểm tra và phân tích 40 mẫu bệnh phẩm tôm chân trắng thì không phát hiện sự có mặt của kí sinh trùng Gregarine trong đường ruột của tôm bị bệnh, ngay cả với những tôm có hiện tượng phân trắng. Trong khi đó, một công bố gần đây của nhóm nghiên cứu của giáo sư Flegel đã cho rằng Gregarine không phải là tác nhân của hội chứng phân trắng đã và đang xảy ra ở tôm chân trắng ở Thái lan (Sriurairatana et al., 2014). Phân tích mô bệnh học của tôm bị phân trắng, các nhà khoa học Thái lan đã phát hiện ra các vật thể có hình dạng giống gregarine trong hệ tiêu hóa

của tôm bị bệnh. Các vật thể lạ này hình thành là do xuất hiện của các cụm tế bào vi lông biến hình (the aggregated, transformed microvilli -ATM) mà những tế bào này sẽ bao vây lấy các tế bào biểu mô bị bong tróc của cơ quan tiêu hóa. Nguyên nhân của sự xuất hiện của các tế bào vi lông đặc biệt vẫn đang tiếp tục được nghiên cứu. Một nghiên cứu khác cũng của các nhà khoa học Thái lan vào năm 2013, đã cho rằng kí sinh trùng vi bào tử trùng *Enterocytozoon hepatopenaei*, có mức độ nhiễm cao ở hệ tiêu hóa của tôm chân trắng, cũng không phải là tác nhân của hội chứng phân trắng này (Tangprasittipap et al., 2013). Như vậy, cả hai nhóm nội kí sinh trùng thường gặp trong hệ tiêu hóa của tôm dường như không phải là nguyên nhân chính của hiện tượng phân trắng. Có hay không sự liên quan giữa hội chứng phân trắng và hội chứng hoại tử gan tụy vẫn còn là một câu hỏi chưa được giải đáp.

3. Kết quả nghiên cứu vi khuẩn

Bảng 2. Tần suất bắt gặp các chủng vi khuẩn phân lập từ tôm bệnh (n=40)

STT	Tên định danh	Tần suất	
		Tần số	Tỷ lệ (%)
1	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	31	77.5
2	<i>V. vulnificus</i>	25	62.5
3	<i>V. alginolyticus</i>	27	67.5
4	<i>V. harveyi</i>	2	5
5	<i>Pseudomonas sp.</i>	3	7.5
6	<i>Plesiomonas sp.</i>	1	2.5
7	<i>Staphylococcus sp.</i>	1	2.5
8	<i>Aeromonas sp.</i>	2	5

Đã có 92 chủng vi khuẩn được phân lập ở nhiệt độ 28-30°C từ gan tụy của 40 mẫu tôm bị bệnh và từ 10 mẫu tôm khỏe, sau đó được định danh bằng phương pháp sinh hóa và PCR. Kết quả là tỷ lệ bắt gặp của loài vi khuẩn *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus* ở 40 mẫu tôm bị bệnh là cao nhất (>60%). Đây là những loài vi khuẩn có độc lực cao và là tác nhân gây bệnh ở đối tượng

thủy sản (Lightner, 1996). Vi khuẩn *V. harveyi* cũng là một chủng vi khuẩn có độc lực cao, là tác nhân gây bệnh ở nhiều loài tôm he nói chung và tôm chân trắng nói riêng, nhất là giai đoạn ấu trùng (Zhou et al., 2012). Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, tỷ lệ bắt gặp loài vi khuẩn này ở các mẫu tôm bị bệnh thu được là rất thấp (5%) nên chúng tôi cho rằng đây chỉ là tác nhân cơ hội. Hơn thế nữa, theo báo cáo của

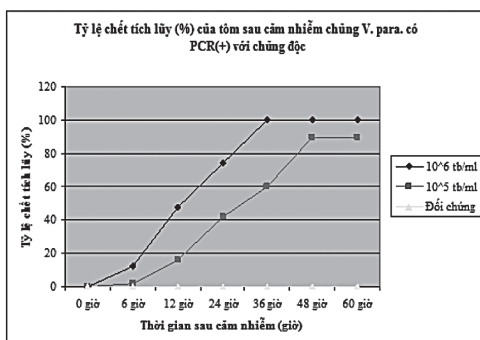
Nguyễn Khắc Lâm (2010), các loài *Vibrio spp.* có mặt rất thường xuyên trong môi trường ao nuôi tôm ở Ninh Thuận. Các loài còn lại, đã được định danh như *Pseudomonas sp.*, *Plesiomonas sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Aeromonas sp.* cũng xuất hiện với tỷ lệ rất thấp (<7.5%) ở các mẫu tôm bị bệnh. Do đó, chúng tôi nghi ngờ rằng loài vi khuẩn *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus* đã đóng vai trò quan trọng trong việc tôm bị bệnh. Ba loài vi khuẩn này được lưu giữ (nhiệt độ -70°C) để làm nguồn vi khuẩn dùng trong thí nghiệm cảm nhiễm.

4. Kết quả phân tích PCR

Bệnh hoại tử gan tụy cấp hay còn gọi là hội chứng chết sớm (AHPND/EMS) thường xảy ra ở giai đoạn đầu nuôi thương phẩm từ hơn 20 ngày-45 ngày tuổi, với những dấu hiệu bệnh lý điển hình như: gan tụy teo nhỏ, màu sắc đen tối, ruột rỗng không có thức ăn, tôm chết rải rác đến hàng loạt. Bệnh xảy ra từ cuối 2009 - đầu 2010, và đã gây thiệt hại lớn cho các nước như: Việt Nam, Trung Quốc, Thái Lan, Malaysia. Theo thống kê của Liên minh

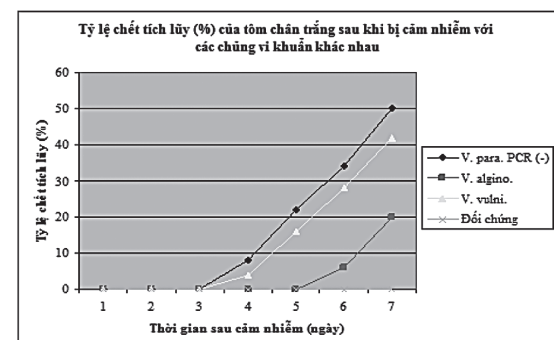
nuôi trồng thủy sản toàn cầu (GAA) thì từ khi xuất hiện đến nay, bệnh AHPND đã gây thiệt hại ước chừng 1 tỷ đô la mỗi năm (FAO, 2013). Tuy nhiên, không phải tất cả các chủng vi khuẩn thuộc loài *V. parahaemolyticus* đều là tác nhân gây hội chứng EMS/AHPNS ở tôm he, mà chỉ có duy nhất 1 chủng có độc tính rất cao mới liên quan tới AHPND (Tran et al., 2013; Lightner et al., 2012 và Nunan et al., 2014). Do vậy, các chủng vi khuẩn loài *V. parahaemolyticus* phân lập được từ các mẫu tôm bị hội chứng gan tụy tại Ninh Thuận được đưa vào phân tích PCR với cặp mồi đặc hiệu AP3 và AP4, được thiết kế để nhận biết chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* là tác nhân gây ra hội chứng hoại tử gan tụy cấp ở tôm (Flegel & Lo, 2014; Sirikharin et al., 2014; Tran et al., 2013). Kết quả phân tích PCR chỉ ra rằng, 21/31 mẫu có phản ứng dương tính (+). Như vậy, chủng vi khuẩn là tác nhân gây bệnh AHPND có mặt trong khoảng 50% số mẫu tôm bị bệnh được kiểm tra (n=40).

5. Kết quả thí nghiệm cảm nhiễm nhân tạo



Hình 3. Tỷ lệ sống trung bình của tôm trong thí nghiệm cảm nhiễm

Để xác định tác hại của các chủng vi khuẩn nghi ngờ và tìm ra chủng vi khuẩn nào có liên quan đến hội chứng hoại tử gan tụy ở tôm chân trắng nuôi tại Ninh Thuận, chúng tôi tiến hành thí nghiệm cảm nhiễm riêng biệt các huyền dịch của các chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* PCR (+), *V. parahaemolyticus* PCR(-), *V. alginolyticus* và *V. vulnificus* với mật độ 10⁶ tế bào/mL. Thí nghiệm kéo dài 7 ngày được tiến hành trong các điều kiện: nhiệt độ:



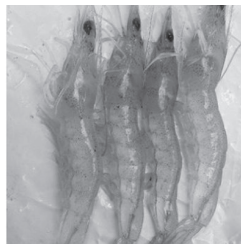
27-28°C, độ mặn: 30-32‰ và pH: 7.5-8. Mô hình thí nghiệm đã được trình bày ở hình 1, kết quả thí nghiệm được ghi nhận, tổng hợp và thể hiện ở hình 3.

Kết quả thí nghiệm cảm nhiễm cho thấy ngoài vi khuẩn *V. parahaemolyticus* PCR (+) được xem là tác nhân gây ra chứng hoại tử gan tụy cấp tính, ba chủng vi khuẩn khác là *V. parahaemolyticus* PCR (-), *V. alginolyticus* và *V. vulnificus* cũng gây chết cao và gây

tác hại nhất định đến cơ quan gan tụy của tôm. Các loài vi khuẩn này có liên quan đến hội chứng gan tụy ở tôm chân trắng nuôi tại Ninh Thuận. Kết quả thí nghiệm chỉ ra rằng, tôm ở các nghiệm thức cảm nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus* PCR(+) bắt đầu chết sau 18-20h và chết 100% trong vòng 36-40h sau cảm nhiễm. Những con tôm hấp hối ở nghiệm thức này đã bộc lộ các dấu hiệu bệnh như: lơ dờ, màu sắc cơ thể và gan tụy nhợt nhạt, dạ dày và ruột rỗng không có thức ăn (hình 4a).

Trong đó, ở nghiệm thức có chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* PCR (-) thì tôm bắt đầu chết sau 48h và sau đó chết rải rác hàng ngày cho đến khi kết thúc thí nghiệm thì tỷ lệ chết tích lũy là 47.7%. Với hai chủng vi

khẩn còn lại, các hiện tượng chết cũng xảy ra nhưng muộn hơn và tỷ lệ chết thấp hơn nhiều so với hai nghiệm thức cảm nhiễm 2 chủng *V. parahaemolyticus*. Tôm cảm nhiễm chủng vi khuẩn *V. vulnificus* bắt đầu chết sau 72h và tỷ lệ chết tích lũy sau 7 ngày là 37.7%. Trong khi đó, ở nghiệm thức cảm nhiễm vi khuẩn *V. alginolyticus*, tôm bắt đầu chết ở ngày thứ 6 trở đi và khi kết thúc thí nghiệm có 17.7% tôm bị chết. Những con tôm hấp hối ở các nghiệm thức này cũng bộc lộ dấu hiệu kém ăn với đường ruột không rõ ràng, màu sắc nhợt nhạt, tổ chức gan tụy phù nề (hình 4b). Tôm ở nghiệm thức đối chứng vẫn còn sống 100% sau 7 ngày trong tình trạng khỏe mạnh, đường ruột và khối gan tụy căng đầy.



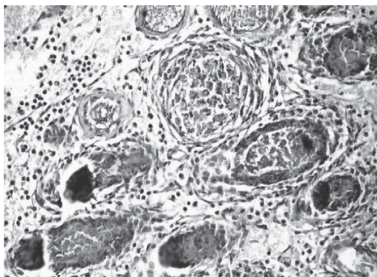
A. Tôm thí nghiệm bị cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* PCR (+)
Tôm lơ dờ, ruột và dạ dày không có thức ăn, gan tụy nhợt nhạt



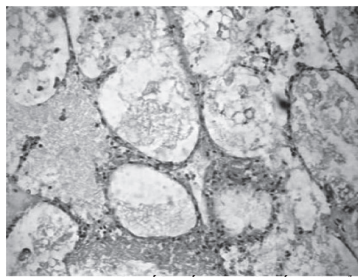
B. Tôm thí nghiệm bị cảm nhiễm *V. alginolyticus*: Gan tụy tôm có màu trắng bất thường, sưng phù, tôm kém ăn hoặc bỏ ăn

Hình 4. Tôm bị bệnh trong thí nghiệm cảm nhiễm nhân tạo

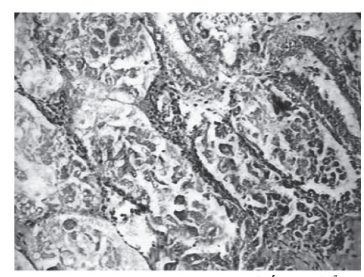
Mô gan tụy của tôm bị bệnh thể hiện những dấu hiệu bệnh lý rất rõ ràng và đa dạng tùy vào giai đoạn và mức độ nặng nhẹ của bệnh được (hình 5).



Sự biến dạng nghiêm trọng của mô gan tụy
(200X)



Sự hoại tử và biến mất của các tế bào biểu mô để lại các ống gan tụy rỗng (200X)



Sự bong tróc và hoại tử của các tế bào biểu mô, sự biến mất của các tế bào B và R (200X)

Hình 5. Biến đổi bệnh lý ở cơ quan gan tụy của tôm chân trắng bị bệnh nhiễm khuẩn

Phản ứng viêm và sự xâm nhập dày đặc của các tế bào máu vào mô liên kết và bao quanh các ống mô gan tụy cho thấy cảm nhiễm của tác nhân gây bệnh vi khuẩn. Sự biến mất của các tế bào B và R ở ống mô gan tụy là một đặc điểm được ghi nhận. Các tế bào biểu mô gan tụy có hiện tượng bong tróc và rơi vào bên trong ống mô gan. Sự hoại tử và biến dạng của

tế bào và ống mô gan tụy có thể được quan sát ở cục bộ hoặc toàn bộ gan tụy. Ngoài ra, còn có thể quan sát thấy sự hình thành các tế bào dạng sợi bao quanh các ổ viêm, đây được xem là giai đoạn cuối của phản ứng viêm. Sự hoại tử và biến mất của các tế bào biểu mô gan tụy đã để lại những ống gan tụy rỗng và sự biến dạng của cấu trúc toàn thể cơ quan gan tụy.

Sự tổn thương nghiêm trọng về tổ chức mô và tế bào ở cơ quan gan tụy chắc chắn đã ảnh hưởng đến chức năng hoạt động của cơ quan này nói riêng và toàn bộ cơ thể tôm nói chung. Các biến đổi bệnh lý mô tả ở trên tương tự với các đặc điểm bệnh lý của AHPNS/EMS được mô tả bởi (FAO, 2013; Joshi et al., 2014; Leaño & Mohan, 2012; Lightner et al., 2012; NACA, 2012; Tran et al., 2013).

IV. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Ba loài vi khuẩn *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* và *V. vulnificus* có liên quan đến hội chứng hoại tử gan tụy ở tôm chân trắng nuôi thương phẩm tại Ninh Thuận (với tần suất bắt gặp > 60%). Đặc biệt, bằng phương pháp PCR, đã xác định được sự có mặt của chủng

vi khuẩn *V. parahaemolyticus* đã được công bố là tác nhân gây hội chứng hoại tử gan tụy cấp ở tôm he nuôi (tỷ lệ bắt gặp khoảng trên 50%). Thí nghiệm cảm nhiễm ngược cho thấy *V. parahaemolyticus* AHPND-PCR (+) có độc lực rất cao gây chết 100% tôm thí nghiệm trong 48h sau cảm nhiễm. Ba loài vi khuẩn khác là *V. parahaemolyticus* PCR(-), *V. alginolyticus* và *V. vulnificus* đều có khả năng gây chết từ rải rác đến hàng loạt và gây tác hại đến cơ quan gan tụy của tôm. Trên mẫu tôm bị bệnh, không tìm thấy sự có mặt của các tác nhân gây bệnh về gan tụy khác như Hepatopancreatic Parvovirus (HPV), vi khuẩn rickettsia. Tỷ lệ nhiễm vi bào tử trùng trong gan tụy của tôm bị bệnh là khoảng 15-20%. Cần tiếp tục nghiên cứu tìm ra các biện pháp phòng trị bệnh hiệu quả.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

1. Nguyễn Khắc Lâm (2010), Nghiên cứu bệnh teo gan trên tôm sú (*Penaeus monodon* Fabricius, 1798) nuôi thương phẩm tại Ninh Thuận và đề xuất các giải pháp phòng bệnh tổng hợp, Luận án Tiến sĩ Nông nghiệp, Trường Đại học Nha Trang.

Tiếng Anh

2. FAO (2013). Report of the fao/mard technical workshop on early mortality syndrome (ems) or acute hepatopancreatic necrosis syndrome (ahpns) of cultured shrimp (under tcp/vie/3304). Hanoi, Viet Nam, on 25–27 june 2013. FAO Fisheries and Aquaculture Report (pp. 55). Rome.
3. Flegel, T. W., & Lo, C.-F. (2014). Announcement regarding free release of primers for specific detection of bacterial isolates that cause AHPND. doi:http://www.enaca.org/modules/news/article.php?article_id=2015
4. Hasson, K. W., Wyld, E. M., Fan, Y., Lingsweiller, S. W., Weaver, S. J., Cheng, J., & Varner, P. W. (2009). Streptococcosis in farmed *Litopenaeus vannamei*: A new emerging bacterial disease of penaeid shrimp. *Dis Aquat Organ*, 86(2), 93-106.
5. Joshi, J., Srisala, J., Sakaew, W., Prachumwat, A., Sritunyalucksana, K., Flegel, T. W., & Thitamadee, S. (2014). Identification of bacterial agent (s) for acute hepatopancreatic necrosis syndrome, a new emerging shrimp. *Suranaree J. Sci. Technol.* doi: http://ird.sut.ac.th/e-journal/ Journal/pdf/140283.pdf.
6. Leaño, E. M., & Mohan, C. V. (2012). Early mortality syndrome threatens asia's shrimp farms. *Global Aquaculture Advocate*, 38-39.
7. Lightner, D. V. (1996). A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp: World Aquaculture Society.
8. Lightner, D. V., Redman, R. M., Pantoja, C. R., Noble, B. I., & Tran, L. (2012). Early mortality syndrome affects shrimp in asia. *Global Aquaculture Advocate Magazine*, 40.

9. NACA. (2012). Report of the asia pacific emergency regional consultation on the emerging shrimp disease: Early mortality syndrome (ems)/ acute hepatopancreatic necrosis syndrome (ahpns). 9-10 aug 2012.
10. Nunan, L., Lightner, D., Pantoja, C., & Gomez-Jimenez, S. (2014). Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (ahpnd) in mexico. *Dis Aquat Organ*, 111(1), 81-86.
11. OIE. (2012). Manual of diagnostic tests for aquatic animals: Renouf Publishing Company Limited.
12. Sirikharin, R., Taengchaiyaphum, S., Sritunyalucksana, K., Thitamadee, S., Flege, T. W., Mavichak, R., & Proespraiwong, P. (2014). A new and improved pcr method for detection of ahpnd bacteria. doi:http://www.enaca.org/modules/news/article.php?article_id=2030
13. Sriurairatana, S., Boonyawiwat, V., Gangnonngiw, W., Laosutthipong, C., Hiranchan, J., & Flegel, T. W. (2014). White feces syndrome of shrimp arises from transformation, sloughing and aggregation of hepatopancreatic microvilli into vermiform bodies superficially resembling gregarines. *PLoS One*, 9(6),
14. Sritunyalucksana et al, 2015. http://www.enaca.org/modules/news/article.php?article_id=2046
15. Tangprasittipap, A., Srisala, J., Chouwdee, S., Somboon, M., Chuchird, N., Limsuwan, C., Srisuvan, T., Flegel, T., & Sritunyalucksana, K. (2013). The microsporidian enterocytozoon hepatopenaei is not the cause of white feces syndrome in whiteleg shrimp *penaeus vannamei*. *BMC veterinary research*, 9(1), 1-10.
16. Tran, L., Nunan, L., Redman, R. M., Mohny, L. L., Pantoja, C. R., Fitzsimmons, K., & Lightner, D. V. (2013). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Organ*, 105, 45-55.
17. Whitman, K. A. (2004). *Finfish and shellfish bacteriology manual: Techniques and procedures* (1st ed.). Ames, USA: Iowa State Press.
18. Zhou, J., Fang, W., Yang, X., Zhou, S., Hu, L., Li, X., Qi, X., Su, H., & Xie, L. (2012). A nonluminescent and highly virulent vibrio harveyi strain is associated with “bacterial white tail disease” of *litopenaeus vannamei* shrimp. *PLoS One*, 7(2)